Plate-forme Analytique – UPJV - Amiens

LG2A Laboratoire de Glycochimie et des Agroressources d'Amiens

A2U ARTOIS - UPJV - ULCO

Année 2023-2024

Proposition de Sujet de Stage de M2

Titre	Evaluation **P**hysico-chimique de l'apport des **Cyclo**dextrines sur la bio**P**roduction de la 7-hydroxytropolone par le *Pseudomonas* PA14H7 et de l'**A**ctivité biologique de la 7-hydroxy**T**ropolone avec ou sans cyclodextrines dans la lutte contre la « jambe noire », une maladie bactérienne de la pomme de terre – **PCycloPAT (Projet A2U-BCE-2023)**
Laboratoire (s)	Plateforme analytique (PFA) et laboratoire LG2A de l'UPJV
Directeur (s)	Serge Pilard, Dominique Cailleu (PFA) et Albert Nguyen Van Nhien (LG2A)
Adresse	UFR des Sciences, 33 rue Saint-Leu, 80039 AMIENS

Superviseur(s)	**David Mathiron (PFA)**, Serge Pilard (PFA), Florence Djedaïni-Pilard (LG2A) et Sylvain Laclef (LG2A)
Adresse(s) e-mail(s)	**david.mathiron@u-picardie.fr**, serge.pilard@u-picardie.fr, florence.pilard@u-picardie.fr, sylvain.laclef@u-picardie.fr
Financement	660 €/mois (6 mois)

Contexte du Projet Scientifique

Dans le cadre de l'alliance A2U un appel à projet « Bioressources et changement environnementaux » (A2U-BCE) a été lancé en novembre 2022 et les projets retenus ont été notifiés en avril 2023, pour une réalisation allant du 2ème trimestre 2023 au 31 décembre 2024. Dans ce cadre le Projet PCycloPAT propose un stage de 6 mois de niveau M2 pendant l'année 2024 (de février à juillet).

Enjeux

La pomme de terre est la troisième culture vivrière mondiale. En France, cette production est le résultat d'une filière organisée, aux normes strictes, promouvant la qualité sanitaire du plant. Dans ce cadre, il a été constaté en 2019/2020 que 2,9% des surfaces de semences ont été refusées lors d'inspections en plein champ, dont 40% à cause d'une maladie provoquée par un complexe bactérien du genre *Pectobacterium* et *Dickeya*, la jambe noire. Actuellement aucune solution pour lutter contre la jambe noire n'est disponible commercialement.

Résultats préliminaires

Des travaux réalisés en interne par la société inov3PT/FN3PT ont montré l'intérêt d'un *Pseudomonas* PA14H7 isolé de la rhizosphère de la pomme de terre pour réduire le risque de jambe noire. Dans le cadre de la thèse d'Euphrasie Lépinay (PFA/LG2A, UPJV-inov3PT/FN3PT), il a été montré que la bactérie PA14H7 produit dans son surnageant de culture la 7-hydroxytropolone (7-HT) sous forme de complexe de Fer ($C_7H_5O_3FeC_7H_5O_3$). Des tests biologiques préliminaires ont validé l'efficacité de ce surnageant et de cette molécule contre *Dickeya*. Parmi les milieux de cultures utilisés pour la croissance de PA14H7, seuls ceux contenant des acides aminés semblent induire la bio-production de 7-HT.

Objectifs du stage et perspective possible

Dans ce projet, la finalité sera d'évaluer l'apport des cyclodextrines (CDs, oligosaccharides cycliques issus de l'amidon) sur la bioproduction de 7-HT par PA14H7 dans différents milieux de culture avec un apport minimum en substrats (glucose, acides aminés).

En effet, il est envisagé que les CDs pourraient améliorer la bioproduction de la 7-HT par PA14H7 en formant un complexe d'inclusion qui masquerait la 7-HT dans le milieu de culture et pourrait ainsi "tromper " la bactérie qui continuerait à produire cette molécule. Cette stratégie a déjà été utilisée avec

succès dans le cas du trans-resvératrol (RSV), molécule connue pour ses propriétés antioxydantes dans le domaine des nutraceutiques et des cosmétiques.
Au préalable, une étude physico-chimique sera réalisée pour sélectionner la ou les CDs candidates et mieux comprendre les interactions potentielles CDs/7-HT, CDs/Fe et CDs/7-HT/Fe qui pourraient exister.
Dans ce cadre, la spectrométrie de masse haute résolution (HRMS) permettra d'observer en introduction directe la présence de complexes si la constante d'association K_a de ces derniers est suffisamment importante. Nous pourrons étudier les différentes interactions potentielles CDs/7-HT, CDs/Fe et CDs/7-HT/Fe en fonction de leur mobilité ionique (IMS) et évaluer la stabilité de ces associations en réalisant des expériences de MS/MS.
La RMN sera utilisée pour mettre en évidence les interactions sous forme de complexes d'inclusion et ainsi renseigner sur le mode d'inclusion du composé invité dans la cavité des CDs et avoir une idée plus précise sur la structure 3D des complexes.
Pour compléter cette étude, l'ITC sera utilisée pour déterminer la stœchiométrie et les paramètres thermodynamiques des complexes (K_a, ΔH, ΔS) en mesurant des dégagements ou absorptions de chaleur lors de l'interaction des différents partenaires. L'ITC se révèlera particulièrement efficace pour étudier des interactions compétitives.
Une fois la ou les CDs candidates sélectionnées, ces dernières seront implémentées aux différents milieux de culture (avec ou sans glucose ou/et avec des acides aminés : phénylalanine, tyrosine et tryptophane, ou encore de l'acide phénylacétique). La quantité de 7-HT produite sera mesurée (LC/HRMS et GC/MS) et des études d'activité in-vitro seront réalisées. De plus, les CDs seules seront également testées sur le complexe bactérien de la jambe noire.

Objectifs du stage :

- Réaliser les analyses MS et RMN à la PFA (UPJV) pour étudier les différentes interactions CDs/7-HT, CDs/Fe et CDs/7-HT/Fe et doser la 7-HT par LC-HRMS et GC/MS dans les milieux de culture.
- Réaliser les expérience ITC, sous la direction du Pr David Landy (laboratoire UCEIV, ULCO/Dunkerque), pour déterminer les paramètres thermodynamiques des complexes. Pour cela, un déplacement à Dunkerque de quelques jours, pris en charge financièrement, est envisagé.

Perspective : à l'issue du stage, en fonction du potentiel du candidat(e) recruté(e), la possibilité de postuler sur un CDD d'Ingénieur d'études (13 mois, éventuellement renouvelables) pour la mise en route et l'utilisation d'un couplage GC/HRMS/IRMS sera proposée.

Techniques et appareillages qui seront susceptibles d'être utilisés durant le stage

Spectrométrie de masse : Synapt G2Si et Vion IMS QTOF (Waters), GC/MS ISQ (Thermo Scientific)
Spectroscopie RMN : RMN 600 MHz (Bruker)
ITC : ITC 200 (Microcal)

Publication récente sur le sujet

Pseudomonas PA14H7 : Identification and Quantification of the 7-Hydroxytropolone Iron Complex as an Active Metabolite against Dickeya, the Causal Agent of Blackleg on the Potato Plant
Molecules **2023**, *28*(17), 6207; https://doi.org/10.3390/molecules28176207